

مطالعه اثر تزریق همزمان اینترلوکین-۱۵، GM-CSF در افزایش ایمنی‌زایی پلاسمید بیانی HIV-1-P24-Nef در مدل موش BALB/c

مهدی مهدوی^۱، معصومه ابتکار^{۲*}، کیهان آزادمنش^۳، فریدون مهبودی^۴، حمیدرضا خرم‌خورشید^۵، فاطمه رهبری‌زاده^۶،
عادل محمدزاده^۷، زهیر محمد حسن^۸

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشکده علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران
- ۶- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۸- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۰۲

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۳۱

چکیده

هدف: بیماری ایدز امروزه به‌عنوان یک مشکل جهانی مطرح است و تلاش فراوانی برای ساخت واکسن مؤثر ضد بیماری ایدز صورت گرفته اما بی‌نتیجه مانده است. DNA واکسن‌ها از جمله واکسن‌های نسل جدید است که می‌تواند سیستم ایمنی را به‌خوبی تحریک نمایند با وجود این، یافته‌های اخیر نمایانگر ایمن‌زایی ضعیف این دسته از واکسن‌ها است و اعتقاد بر اینست که این دسته از واکسن‌ها نیاز به عواملی چون ادجوانت‌ها دارد تا ایمنی‌زایی بیشتری کسب نماید. در این پژوهش DNA واکسن کاندید برای HIV-P24-Nef ساخته شده است و سپس با استفاده از ادجوانت‌های ژنی اینترلوکین-۱۵ و GM-CSF پاسخ‌های ایمنی سلولی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ساختار ژنی HIV-P24-Nef در ناقل بیانی یوکاریوتی ساخته شد و به‌عنوان ادجوانت از پلاسمیدهای بیانی اینترلوکین-۱۵ و GM-CSF استفاده شد پس از تزریق واکسن کاندید به موش‌های BALB/c پاسخ‌های سیتوکینی، تکثیر لنفوسیت‌ها و سایتوتوکسیسیته لنفوسیت‌ها بررسی شد.

نتایج: یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که واکسن کاندید به‌طور معنی‌داری پاسخ‌های ایمنی سلولی را تحریک نموده است و استفاده از ادجوانت‌های ژنی اینترلوکین-۱۵ و GM-CSF به‌صورت مجزا با واکسن کاندید، پاسخ‌های ایمنی سلولی را به‌طور معنی‌داری تقویت نموده است. تزریق همزمان ادجوانت‌های ژنی در حالی‌که نسبت دوز واکسن بیشتر از ادجوانت باشد پاسخ‌های ایمنی سلولی را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری: توالی‌هایی که در بررسی حاضر به‌عنوان واکسن کاندید انتخاب شد ایمنی‌زایی خوبی در مدل موشی از خود نشان داده است و تزریق همزمان ادجوانت‌های ژنی اینترلوکین-۱۵ و GM-CSF موجب افزایش پاسخ ایمنی سلولی به DNA واکسن می‌شود.

کلیدواژگان: ژن اینترلوکین-۱۵، ژن GM-CSF، پلاسمید بیانی HIV-1-P24-Nef، ایمنی‌زایی، موش BALB/c

۱- مقدمه

بیماری ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) مهلک و خطرناک است و عامل یک مرگ از هر ۵ مورد در منطقه آفریقا است [۱]. تلاش‌های زیادی برای مهار بیماری در دنیا صورت گرفته است که از جمله آن پیدایش داروهای ضد ویروس AIDS است. این داروها میزان مرگ و میر مبتلایان به AIDS را در بسیاری از کشورها کاهش داده است اما به دلیل هزینه بالا و عدم موفقیت در ریشه‌کنی کامل ویروس AIDS موفقیت امیدوارکننده‌ای حاصل نشده است [۲]. بنابراین انتظار می‌رود یک واکسن مؤثر و کارا بتواند پاندمی (Pandemic) ایجاد شده از این بیماری را مهار نماید [۱، ۳].

DNA واکسن‌ها از جمله واکسن‌های نسل جدید است که قادر است ایمنی سلولی و ایمنی همورال خوبی تحریک نماید و از این سو بسیار مورد توجه قرار گرفته و حتی مراحل متعددی از مراحل بالینی انسان را نیز گذرانده است [۳]. با این وجود یافته‌های اخیر نمایانگر عدم کارایی این دسته از واکسن‌ها است و اعتقاد بر اینست که این دسته از واکسن‌ها باید با عواملی چون ادجوانت‌ها (Adjuvants) ایمنی‌زایی بیشتری کسب نمایند [۴]. برای ساخت واکسن مؤثر ضد ویروس AIDS پروتئین‌های بخش‌های مختلف ویروس به‌عنوان کاندید مطرح شده است که از جمله آن، پروتئین P24 است [۵]. مطالعات متعددی اهمیت این پروتئین در پاسخ‌های ضد ویروس AIDS را نشان می‌دهد. این پروتئین که از پوشش داخلی ویروس است، می‌تواند موجب القای پاسخ‌های قدرتمند سایتوتوکسیسیته سلولی در میزبان شود و بنابراین می‌تواند تا حدی گسترش ویروس را مهار نماید [۵-۷]. تجربیات متعددی نشان داده است که پاسخ‌های ایمنی قدرتمند ضد پروتئین P24 با مهار پیشروی بیماری AIDS و کاهش سطح سرمی ویروس همراه است. بنابراین پروتئین P24 می‌تواند کاندید مناسبی برای ساخت واکسن ضد ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان (Human Immunodeficiency Virus: HIV) باشد [۶، ۸].

از سوی دیگر تحقیقات نشان می‌دهد که اپی‌توپ‌های ایمونوژن (Immunogene) متعددی در پروتئین Nef وجود دارد که می‌تواند سیستم ایمنی سلولی و همورال را به‌خوبی تحریک نماید [۹]. پروتئین Nef که یک پروتئین ۲۷ کیلودالتونی و سیتوپلاسمی است، در چرخه تکثیر ویروس و پیشرفت بیماری AIDS نقش اساسی دارد [۱۰]. این پروتئین یک پروتئین کمکی در مراحل اولیه تکثیر ویروس است؛ بنابراین القای پاسخ ایمنی بر ضد آن می‌تواند تا حدی عفونت ویروسی را مهار نماید [۱۰، ۱۱]. نتایج بررسی پاسخ‌های ایمنی در مدل‌های موشی نشان می‌دهد که تزریق Nef به این حیوانات موجب القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال قوی بر ضد پروتئین Nef می‌شود و همچنین پاسخ‌های ایمنی ایجاد شده از دوام و پایداری خوبی نیز برخوردار است؛ از این رو می‌توان آن را کاندید مناسبی برای ساخت واکسن‌های چند اپی‌توپی دانست [۹]. القای پاسخ‌های ایمنی گسترده بر ضد ویروس HIV-1 مستلزم به‌کارگیری اپی‌توپ‌های متعدد در غالب یک واکسن کاندید است؛ زیرا تنها به این شیوه است که می‌توان پاسخ وسیع و گسترده‌ای علیه بخش‌های مختلفی از ویروس AIDS ایجاد نمود. از این رو واکسن‌های چند اپی‌توپی با این دید، مورد توجه قرار گرفته و موفقیت‌های چشمگیری نیز کسب نموده است [۱۲-۱۴]. با توجه به اهمیت چنین واکسن‌هایی، در تحقیق حاضر با در نظر گرفتن اپی‌توپ‌های ایمونوژن ویروس HIV-1، اپی‌توپ‌های ایمونوژن پروتئین‌های P24 (اسیدآمینو ۱۵۹-۱۷۳) و Nef (اسیدآمینو ۱۰۲-۱۱۷) در غالب یک DNA واکسن انتخاب شد و از آن برای بررسی پاسخ‌های ایمنی استفاده شد [۱۱]. از سوی دیگر برای افزایش سطح پاسخ‌های ایمنی، از ژن‌های سیتوکین‌ها (Cytokines)، به‌کار گرفته شد. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که به‌کارگیری ژن‌های سیتوکینی موجب افزایش سطح ایمن‌زایی DNA واکسن‌ها می‌شود [۱۵]. سیتوکین‌ها با مکانیسم‌های متعددی منجر به بهبود پاسخ‌های ایمنی می‌شود

بیانی یوکاریوتی pcDNA3.1 Hygro⁺ کلون شد. پلاسمید نو ترکیب به دست آمده در باکتری Top10 F'، ترانسفورم شده و پس از کشت مایع در مقیاس انبوه، تخلیص پلاسمید با استفاده از کیت‌های تجاری عاری کننده از اندوتوکسین باکتری (Qiagen, Germany) (Endofree plasmid Giga Kit)، در مقیاس گیگا انجام شد. محصولات استخراج شده از نظر خلطت و کیفیت و خلوص بررسی شد و در نهایت در بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) استریل، رقیق و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد. در مراحل بعدی تأیید بیان ژن مورد نظر با استفاده از پروتئین فلورسانس GFP (Green Fluorescent Protein) انجام شد. بدین منظور مقدار ۴۰۰ نانوگرم از پلاسمید نو ترکیب که شامل HIV-P24-Nef متصل شده با ژن GFP بود، با لیپوفکتامین (Lipofectamine 2000) ۲۰۰۰ مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد و سپس به سلول HEK 293 ترانسفکت شد. بدین ترتیب که سلول‌های مذکور ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن، به پلیت ۲۴ خانه‌ای، با تراکم ۷×۱۰^۴ در میلی‌لیتر محیط کشت قرار داده شد و سپس مخلوط پلاسمید و لیپوفکتامین به سلول‌ها اضافه شد و همزمان پلیت نیز به آرامی تکان داده شد. ۱۸ ساعت بعد، تعویض محیط صورت گرفت و بعد از ۷۲ ساعت بیان ژن با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد (شکل ۲). همچنین ژن‌های IL-15 (در ناقل PCDNA3.1) و GM-CSF (در ناقل PTV0) به صورت اهدایی (بخش بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران) تهیه شد.

```
CCAAGCTTGCCACCATGGCCCACCACCACCACCACCA
CTATGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGATTCTATA
AAACTCTAAGAGCCGCTATCACTCCCAAAGAAGACA
AGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACA
TAACGCGGATCCGCGTTATGTG
```

شکل ۱ بخشی از توالی کلون HIV-1-P24-Nef؛ توالی مربوط به قطعات ژنی Nef و P24، توالی‌های مشخص شده در دو طرف مربوط به آغازگرها (Primers) و نواحی مشخص شده کلون در وسط مربوط به توالی پیوند دهنده (Linker) است.

آن‌ها با اثر بر سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن یا با اثر بر لنفوسیت‌های سیستم ایمنی موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی یا ایمنی همورال می‌شوند [۱۶]. یافته‌های متعددی آثار ادجوانتی ایتروکین-۱۵ (Interleukin-15: IL-15) و GM-CSF (Granulocyte/macrophage colony stimulating factor) را تأیید نموده است [۱۷-۱۹]. سیتوکین‌ها با جابه‌جایی (Shift) پاسخ ایمنی به سمت پاسخ‌های دلخواه قادرند کارایی DNA واکسن‌ها را بهبود بخشند [۲۰]. با توجه به آثار ادجوانتی خوب GM-CSF و نقش آن در بلوغ و تمایز سلول‌های عرضه‌کننده ایمنی [۲۱-۲۳] و از سوی دیگر، آثار تعدیل‌کنندگی IL-15 بر لنفوسیت‌ها و القای جابه‌جایی پاسخ‌های Th1 (T helper 1) در لنفوسیت‌ها [۲۴-۲۶] در تحقیق حاضر با به‌کارگیری همزمان دو ادجوانت مذکور و تحریک مستقیم همزمان لنفوسیت‌های اختصاصی و از سوی دیگر، سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، به مطالعه آثار ایمونولوژیک آن پرداخته و کارایی این استراتژی در غالب مدل DNA واکسن HIV بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساخت پلاسمید نو ترکیب

قطعه ژنی HIV-1P24-Nef شامل توالی‌های P24 (اسید آمینه ۱۷۳-۱۵۹) و Nef (اسید آمینه ۱۰۲-۱۱۷) است و برای بیان در سیستم یوکاریوتی توالی کوزاک (Kozak sequence) قبل از ناحیه ژنی P24-Nef پیش‌بینی شد. این قطعه ژنی توسط شرکت GL Biochem از کشور چین در ناقل کلونی PUC18 سنتز شده و در اختیار محققان حاضر قرار گرفت. قطعه ژنی با هضم آنزیمی دو آنزیم *HindIII* و *BamHI* برش داده شد. توالی ژنی پس از مشخص شدن با تعیین توالی (Sequencing) تأیید شد (شکل ۱). سپس قطعه ژن مورد نظر از روی ژل استخراج و سپس در همان موقعیت آنزیمی در ناقل

گروه ۱: موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید GM-CSF
HIV-1P24-Nef + (۳۳ میکروگرم) IL-15 + (۳۳ میکروگرم)
(۳۳ میکروگرم)

گروه ۲: موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید GM-CSF
HIV-1P24-Nef + (۲۵ میکروگرم) IL-15 + (۲۵ میکروگرم)
(۵۰ میکروگرم)

گروه ۳: موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید GM-CSF
(۵۰ میکروگرم) HIV-1P24-Nef + (۵۰ میکروگرم)

گروه ۴: موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید IL-15
(۵۰ میکروگرم) HIV-1P24-Nef + (۵۰ میکروگرم)

گروه ۵: موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید HIV-1P24-Nef
(۱۰۰ میکروگرم)

گروه ۶: موش‌های کنترل؛ دریافت‌کننده پلاسمید
PCDNA3.1 (۱۰۰ میکروگرم)

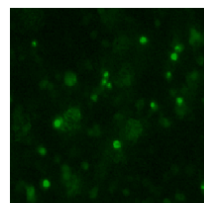
گروه ۷: موش‌های کنترل؛ دریافت‌کننده پلاسمید PTV0
(۱۰۰ میکروگرم)

گروه ۸: موش‌های کنترل؛ دریافت‌کننده پلاسمید
PTV0 + (۵۰ میکروگرم) PCDNA3.1 (۵۰ میکروگرم)

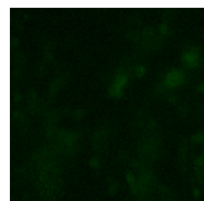
گروه ۹: موش‌های کنترل؛ دریافت‌کننده بافر PBS
در هر گروه پنج سر موش قرار داده شد و موش‌ها در روز
صفر و روز ۲۸ با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر؛ پلاسمید دریافت
کردند [۲۷]. همچنین ۴ هفته پس از تزریق یادآور، موش‌ها
مورد ارزیابی پاسخ‌های ایمنی قرار گرفتند.

۲-۵- بررسی پاسخ‌های تکثیری

بدین منظور چهار هفته پس از تزریق یادآور، موش‌ها
نخاعی شده و در الکل هفتاد درجه غوطه‌ور شدند، سپس در
زیر هود لامینار (Laminar hood) طحال از بدن آن‌ها خارج
شد و در پلیت استریل با ته سرنگ له و سوسپانسیون شده و
دو بار در PBS سرد و دور ۳۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد
به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد و به رسوب به دست آمده بافر
لیزکننده به حجم ۵ میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در



الف



ب

شکل ۲ بیان پلاسمید HIV-P24-Nef با استفاده از ترانسفکشن سلول‌های HEK293 به کمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و به‌کارگیری ژن GFP به‌عنوان ژن گزارش‌گر؛ الف) مربوط به ترانسفکشن سلول‌ها با ناقل حاوی ژن‌های GFP ادغام شده با ژن HIV-P24-Nef است و سلول‌های مثبت به‌صورت فلورسانس سبز مشاهده می‌شود. ب) مربوط به ترانسفکشن سلول‌ها با پلاسمید غیرنو ترکیب است.

۲-۲- پیتید

پیتید اتصالی HIV-P24-Nef شامل توالی‌های P24 (اسیدآمینه ۱۵۹-۱۷۳) و Nef (اسیدآمینه ۱۰۲-۱۱۷) توسط شرکت GL Biochem از کشور چین در فاز جامد سنتز شده و با خلوص بالای ۹۵ درصد در اختیار محققان حاضر قرار گرفت.

۲-۳- حیوان آزمایشگاهی

تعداد ۴۵ سر موش BALB/c ماده ۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران (کرج) خریداری شد و براساس اصول مراقبت و نگهداری از موش‌های آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شد.

۲-۴- تزریق DNA واکسن به‌همراه

ادجوانت‌های ژنی

DNA واکسن به موش‌ها به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد. همچنین به هر موش، ۱۰۰ میکروگرم پلاسمید تزریق شد. موش‌های مورد مطالعه به گروه‌های زیر تقسیم شدند که شامل:

بارگذاری شد، به‌عنوان محرک استفاده شد. از سلول‌های P815 بارگذاری شده با پپتید به تعداد 2×10^4 سلول در حفره‌ای از پلیت ۹۶ خانه‌ای ELISPOT که قبلاً با آنتی‌بادی ضد گرانزیم B پوشیده (Coat) شده بود اضافه شد و سپس از سوسپانسیون طحالی موش‌های گروه‌های مختلف به نسبت ۵۰ برابر (1×10^6) به حفرات اضافه شد. همچنین به‌عنوان کنترل منفی، سلول‌های هدف و پاسخ‌گو به‌صورت تنها و سلول هدف بارگذاری نشده با پپتید نیز به‌صورت مشابه با نسبت‌های مذکور در مجاورت سلول‌های طحالی قرار گرفت و از گرانزیم نو ترکیب نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از چهار ساعت انکوباسیون در 37°C درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 پلیت‌ها با بافر شستشو، ۴ بار شستشو داده شد و آنتی‌بادی ضد گرانزیم B به نسبت $1/60$ به حفرات اضافه شد و پلیت به مدت ۱۸ ساعت در یخچال 4°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در مرحله بعد پلیت چهار بار شستشو داده شده و کونژوگه استرپتوآویدین-آلکالین فسفاتاز (Streptavidin-alkaline phosphatase) به نسبت $1/1000$ به مقدار 100 میکرولیتر به حفرات اضافه شد. انکوباسیون، ۲ ساعت در شرایط آزمایشگاه ادامه یافت و در نهایت پس از شستشوی پلیت‌ها، سوبسترای BCIP/NBT (5-bromo, 4-chloro, 3-indolylphosphate/nitro blue chloride) به مقدار 100 میکرولیتر به حفرات اضافه شد و پلیت به مدت یک ساعت در شرایط آزمایشگاه و تاریکی نگهداری شد. سپس با آب مقطر سه بار شستشو داده شد تا نقاط پدیدار شود. تعداد سلول‌های تولیدکننده گرانزیم B از تفاوت نقاط در حفرات آزمون با نقاط حفرات کنترل منفی به دست آمد.

۷-۲-۷- ELISPOT سیتوکین‌های IL-4 و

اینترفرون گاما (Interferon-gamma: IFN- γ)

برای بررسی پاسخ سیتوکینی نیز از روش ELISPOT استفاده شد و روش انجام آزمایش براساس برنامه ارائه شده از سوی شرکت تولیدکننده (Mabtech, Sweden) بود. از

دمای اتاق قرار گرفت. برای خارج نمودن سلول‌ها از شوک اسموتیک (Osmotic shock)، مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط FBS + RPMI-1640 (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد به آن‌ها اضافه شد. پس از عبور سلول‌ها از الک سلولی سه بار در PBS سرد شستشو شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت FBS + RPMI-1640 ۱۰ درصد به تعداد 4×10^6 در میلی‌لیتر سوسپانسیون شد و 100 میکرولیتر از این سوسپانسیون که دارای 4×10^6 سلول است، در هر حفره ۹۶ خانه‌ای پلیت مسطح اضافه شد. سپس آنتی‌ژن با غلظت 10 میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. سلول تنها به‌عنوان کنترل منفی و به‌عنوان کنترل مثبت؛ PHA (Phytohemagglutinin) به غلظت 5 میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. حجم نهایی تمام حفرات 200 میکرولیتر بود و پس از کشت 72 ساعته در انکوباتور 37°C درجه و ۵ درصد CO_2 ، به حفرات به میزان $0/7$ میکروکوری تایمیدین نشان‌دار اضافه شد و کشت به مدت ۱۸ ساعت دیگر ادامه یافت و در نهایت پس از هاروست (Harvest) سلول‌ها میزان تکثیر براساس cpm (Count per minute) و با استفاده از دستگاه شماش‌گر بتا (Beta Counter) (Pharmacia, Sweden) مشخص شد. نتایج پاسخ تکثیری به‌صورت شاخص تحریک (Stimulation Index: SI) (cpm سلول‌های تحریک نشده/cpm سلول‌های تحریک شده) ارائه شده است.

۶-۲- بررسی پاسخ‌های سیتوتوکسیسیته اختصاصی

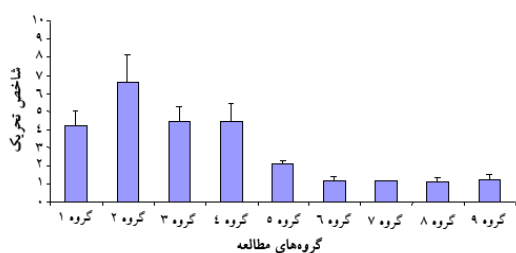
آنتی‌ژن

برای بررسی پاسخ‌های سیتوتوکسیک از روش ELISPOT گرانزیم B (Granzyme B ELISPOT) استفاده شد. روش کار در این مطالعه دقیقاً براساس برنامه ارائه شده از سوی شرکت تولیدکننده (R&D، آمریکا) بوده است. بدین منظور از سوسپانسیون سلولی به دست آمده طحالی به‌عنوان سلول‌های تحریک‌شونده استفاده شد و از سلول‌های P815 که یک شب با مقدار 20 میکروگرم در میلی‌لیتر با پپتید HIV-1P24-Nef

۳- نتایج

۳-۱- پاسخ تکثیری لنفوسیتی

نتایج پاسخ‌های تکثیری بر حسب SI در گروه‌های آزمایش نشان (نمودار ۱) می‌دهد که تزریق DNA واکسن HIV-P24-Nef موجب افزایش پاسخ‌های تکثیری می‌گردد و این افزایش پاسخ تکثیری با گروه‌های کنترل دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ($P < 0/017$). از سوی دیگر استفاده از ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF نیز در مقایسه با DNA واکسن تنها پاسخ‌های تکثیری واکسن را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است ($P < 0/0021$). به‌کارگیری همزمان دو ادجوانت مذکور به همراهی DNA واکسن کاندید در گروه اول، در مقایسه با واکسن کاندید بدون ادجوانت (گروه ۵) افزایش معنی‌دار پاسخ‌های تکثیری را نشان می‌دهد ($P < 0/036$). اما در مقایسه با گروه‌های ۳ و ۴ اختلاف معنی‌داری نداشته است. اما در گروه دوم که با نسبتی متفاوت ادجوانت‌ها و واکسن کاندید را دریافت نموده بودند باعث افزایش معنی‌دار پاسخ‌های تکثیری در مقایسه با گروه‌های ۳ و ۴ و همچنین با گروه ۱ گردیده است ($P < 0/034$). این یافته نشان می‌دهد که افزایش نسبت واکسن به ادجوانت‌های ژنی ایمنی‌زایی واکسن کاندید را در گروه دوم نسبت به گروه اول افزایش داده است.



نمودار ۱ پاسخ تکثیری سلول‌های طحالی به آنتی‌ژن؛ داده‌ها به‌صورت شاخص تحریک نشان داده شده است و نمودار شامل میانگین \pm انحراف معیار می‌باشد. به‌کارگیری DNA واکسن (گروه ۵) باعث افزایش معنی‌دار پاسخ‌های تکثیری در مقایسه با گروه‌های کنترل گردید ($P = 0/017$). استفاده از GM-CSF و IL-15 (گروه‌های ۳ و ۴) به‌طور معنی‌داری پاسخ‌های تکثیری را در مقایسه با DNA واکسن افزایش داده است ($P = 0/0021$) و تزریق همزمان دو ادجوانت ژنی در حالتی که نسبت واکسن از ادجوانت‌ها بیشتر بوده است (گروه ۲) بیشترین سطح پاسخ‌های تکثیری را ایجاد نموده است ($P = 0/034$).

سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده از طحال در محیط کشت سلولی FBS + RPMI ۱۰ درصد سوسپانسیونی به تعداد 1×10^7 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه نموده و در پلیت ELISPOT از قبل پوشیده شده با آنتی‌بادی IFN- γ و یا IL-4 به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معادل یک میلیون سلول اضافه گردید. سپس آنتی‌ژن با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه گردید و به‌عنوان کنترل مثبت به برخی حفرات PHA با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شده و به‌عنوان کنترل منفی سلول تنها و یا محیط کشت تنها اضافه گردید. سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند و پس از آن پلیت‌ها ۵ بار با PBS شستشو داده شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد IL-4 و یا IFN- γ به رقت ۱/۶۰ که در PBS حاوی نیم درصد FBS تهیه گردید به حفرات اضافه گردید. سپس پلیت‌ها دو ساعت در شرایط آزمایشگاه انکوبه شدند و پس از شستشو کونزوگه استرپتوآویدین-آلکالین فسفاتاز به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰۰ که در PBS حاوی نیم درصد FBS تهیه گردیده بود به حفرات اضافه شد. انکوباسیون یک ساعت دیگر ادامه یافت و در نهایت پس از شستشو پلیت‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای BCIP/NBT به حفرات اضافه شده و پلیت‌ها در شرایط آزمایشگاه و تاریکی به‌مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شد تا نقاط پدیدار شد. پلیت‌ها سه بار با آب مقطر شستشو داده شده و تعداد سلول‌های تولیدکننده IL-4 و یا IFN- γ از تفاوت نقاط در حفرات آزمون با نقاط حفرات کنترل منفی به‌دست آمد.

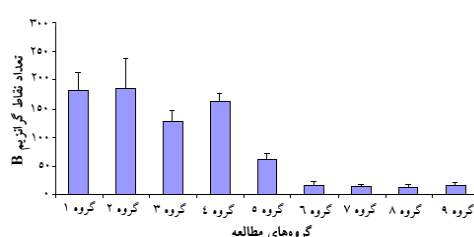
۲-۸- بررسی آماری

تمامی آزمایشات به‌صورت سه‌تایی انجام گردید و در ابتدا از داده‌های به‌دست آمده میانگین به‌دست آمد و با توجه به طبیعی بودن داده‌ها برای مقایسه کلی بین گروه‌ها از آزمون آنوای یک سویه (One-way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey's test) در سطح ۹۵ درصد اطمینان استفاده شد. همه داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند و عدد P کوچک‌تر از ۰/۰۵ به مفهوم معنی‌دار بودن می‌باشد.

۳-۲- بررسی پاسخ‌های سایتوتوکسیسیته اختصاصی

آنتی ژن

برای بررسی پاسخ‌های سایتوتوکسیک در این پژوهش از روش ELISPOT گرانزیم B استفاده شد. از مزایای این روش آنالیز این فرایند در سطح یک سلول است و جایگزین مناسبی برای روش‌های دیگر سنجش سایتوتوکسیسیته است [۲۸]. در این پژوهش براساس بهینه‌سازی‌های اولیه از نسبت ۱/۵۰ سلول هدف به سلول مؤثر استفاده شد. یافته‌های محققان حاضر نشان می‌دهد که ساختار ژنی HIV-P24-Nef به‌طور معنی‌داری پاسخ‌های سایتوتوکسیسیته را در مقایسه با گروه‌های کنترل القا نموده است ($P < 0/012$). استفاده از ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF با واکسن کانیدید (گروه‌های ۳ و ۴) نیز موجب افزایش معنی‌داری پاسخ‌های سایتوتوکسیک نسبت به گروه واکسن تنها (گروه ۵) شده است ($P < 0/029$). همچنین بین این دو گروه (۳ و ۴)، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشده است. از سوی دیگر استفاده ترکیبی دو ادجوانت مذکور با واکسن کانیدید باعث افزایش پاسخ‌های سایتوتوکسیک شده است اما اختلاف مشاهده شده در گروه اول با گروه‌های ۳ و ۴ معنی‌دار نیست ولی این افزایش در گروه ۲ با گروه ۳ معنی‌دار است ($P < 0/038$) ولی با گروه ۴ این اختلاف معنی‌دار نبوده است (نمودار ۲).



نمودار ۲ بررسی پاسخ‌های سایتوتوکسیک با استفاده از روش ELISPOT گرانزیم B با نسبت بهینه شده ۱/۵۰ سلول هدف به سلول مؤثر؛ نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. تزریق DNA واکسن (گروه ۵) باعث افزایش معنی‌داری پاسخ‌های سایتوتوکسیک در مقایسه با گروه‌های کنترل شد ($P = 0/012$). استفاده از GM-CSF و IL-15 (گروه‌های ۳ و ۴) به‌طور معنی‌داری پاسخ‌های سایتوتوکسیک را در مقایسه با DNA واکسن افزایش داده است ($P = 0/029$). تزریق همزمان دو ادجوانت ژنی در حالتی که نسبت واکسن از ادجوانت‌ها بیشتر بوده است (گروه ۲)، بیشترین سطح پاسخ‌های سایتوتوکسیک را ایجاد نموده؛ اما تنها با گروه ۳ دارای اختلاف معنی‌دار بوده است ($P = 0/034$).

۳-۳- بررسی الگوی سیتوکینی

بررسی الگوی سیتوکینی با روش ELISPOT انجام شد. در این پژوهش با سنجش دو سیتوکین IL-4 و IFN- γ الگوی سیتوکینی مورد تحلیل قرار گرفت. یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق DNA واکسن کانیدید به موش‌ها موجب تحریک تولید IFN- γ در مقایسه با گروه‌های کنترل می‌شود (جدول ۱) و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است ($P < 0/027$). از سوی دیگر، به‌کارگیری ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه واکسن کانیدید (گروه‌های ۳ و ۴) نیز موجب افزایش معنی‌دار تعداد لنفوسیت‌های تولیدکننده IFN- γ نسبت به گروه واکسن تنها (گروه ۵) شد ($P < 0/018$). همچنین بین دو گروه ۳ و ۴ از نظر تولید IFN- γ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/021$). از سوی دیگر، استفاده همزمان دو ادجوانت مذکور با واکسن کانیدید در گروه دوم نسبت به گروه اول افزایش نشان داد که از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/034$). ولی تعداد سلول‌های تولیدکننده IFN- γ در گروه ۱ نسبت به گروه ۴، کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/041$). همچنین به‌کارگیری دو ادجوانت ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه واکسن کانیدید در گروه ۲ موجب افزایش لنفوسیت‌های تولیدکننده IFN- γ نسبت به گروه‌های ۳ و ۴ شد ($P < 0/027$).

بررسی فراوانی لنفوسیت‌های تولیدکننده IL-4 در این مطالعه نشان داد (جدول ۱) که با تزریق DNA واکسن کانیدید، تعداد لنفوسیت‌های تولیدکننده IL-4 در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری می‌یابد ($P < 0/039$). همچنین تزریق ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه واکسن کانیدید (گروه‌های ۳ و ۴) نیز موجب افزایش معنی‌دار لنفوسیت‌های تولیدکننده IL-4 نسبت به گروه واکسن تنها (گروه ۵) شد ($P < 0/035$). از سوی دیگر، استفاده همزمان از دو ادجوانت مذکور با واکسن کانیدید در گروه اول نسبت به گروه‌های ۳ و ۴، افزایش نشان داد که از نظر آماری تنها با گروه ۴ معنی‌دار بود ($P < 0/043$). همچنین تعداد سلول‌های تولیدکننده IL-4 در گروه ۲ نسبت به گروه‌های ۳ و ۴ دارای افزایش

معنی‌دار بود ($P < 0/036$). اما بین گروه‌های ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۱ بررسی فراوانی سلول‌های تولیدکننده IL-4 و IFN- γ با استفاده از روش ELISPOT؛ نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

سیتوکین	گروه								
	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱
IL-4 \pm انحراف معیار	۱۶ \pm ۶	۱۱ \pm ۴	۱۴ \pm ۶	۱۵ \pm ۵	۵۷ \pm ۹	۱۹۰ \pm ۴۴	۲۰۷ \pm ۲۳	۲۷۶ \pm ۳۰	۲۳۴ \pm ۳۲
IFN- γ \pm انحراف معیار	۱۷ \pm ۴	۱۴ \pm ۳	۱۵ \pm ۵	۱۳ \pm ۶	۷۷ \pm ۱۳	۳۴۰ \pm ۴۷	۲۱۹ \pm ۴۹	۴۴۵ \pm ۵۳	۲۸۲ \pm ۲۹

۴- بحث

با وجود آن‌که تلاش فراوانی برای ساخت یک واکسن مؤثر بر ضد ویروس HIV صورت گرفته است اما هنوز بحث در مورد واکسن‌های کاندید با یک تناقض آشکار مواجه است و جوامع همچنان در معرض انتشار بیشتر این بیماری مهلک هستند [۲۹]. داروهای زیادی علیه ویروس HIV مطرح بود، اما قادر به ریشه‌کنی عفونت نبوده‌اند. بنابراین به نظر می‌رسد شاید ساخت یک واکسن مؤثر تنها راه‌کار موجود باشد [۳۰]. یافته‌های علمی بیانگر آنست که برای تحریک بهتر و گسترش بیشتر پاسخ‌های ایمنی به‌کارگیری واکسن دارای اپی‌توپ‌های ایمونوژن و توالی‌های حفاظت‌شده (Conserved) می‌تواند راه‌کار مناسبی باشد؛ زیرا در این حالت پاسخ ایمنی هدفمندتر بوده و از سوی دیگر با شدتی بیشتر به مقابله با بیماری‌زا برمی‌خیزد [۳۱، ۳۲]. در این پژوهش توالی‌های P24 (اسیدآمین ۱۵۹-۱۷۳) و Nef (اسیدآمین ۱۰۲-۱۱۷) به صورت متصل شده استفاده شده است. بررسی‌ها در مورد این توالی‌ها نشان می‌دهد که دو توالی مذکور از حفاظت‌شده‌ترین توالی‌های موجود در ویروس بوده و از سوی دیگر بالاترین سطح پاسخ‌های سایتوتوکسیسیته بر ضد این توالی‌ها است [۱۱، ۳۲، ۳۳].

بررسی پاسخ‌های تکثیری لئوسیت‌ها پس از تزریق DNA واکسن کاندید نشان داده است که موجب افزایش معنی‌دار پاسخ‌های تکثیری در مقایسه با گروه‌های کنترل شده است. از سوی دیگر، تزریق همزمان ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه

واکسن (گروه‌های ۳ و ۴) نیز موجب افزایش معنی‌دار پاسخ‌های تکثیری در مقایسه با گروه‌های کنترل و گروه DNA واکسن تنها شده است. همچنین استفاده ترکیبی از ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه واکسن کاندید (گروه‌های ۱ و ۲) نیز موجب افزایش پاسخ‌های تکثیری شده است. اما تنها در گروه ۲ موجب القای یک پاسخ تکثیری چشمگیر و معنی‌دار در مقایسه با سایر گروه‌ها شده است. مطالعات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد به‌کارگیری ادجوانت‌های ژنی موجب افزایش سطح پاسخ‌های ایمنی می‌شود [۳۴]. به‌کارگیری GM-CSF در مطالعات متعددی آثار تقویت‌کنندگی آن را بر پاسخ‌های ایمنی به اثبات رسانده است [۱۷، ۳۵، ۳۶]. همچنین مطالعات متعددی نشان می‌دهد که IL-15 نیز در همراهی با DNA واکسن‌ها کارایی آن‌ها را افزایش می‌دهد [۳۷-۳۹]. در مطالعه حاضر نیز نتایج مذکور تأیید شد. از سوی دیگر، استفاده ترکیبی از ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه واکسن کاندید باعث افزایش پاسخ‌های تکثیری شده است؛ اما ظاهراً هرگاه نسبت واکسن بیشتر از ادجوانت باشد (گروه ۲) سطح پاسخ‌های تکثیری بیشتر است. این امر شاید به دلیل افزایش بیان کلی پروتئین در این گروه نسبت به گروهی که پلاسمید واکسن کاندید را به مقدار کمتری دریافت می‌کند، باشد. در این پژوهش اولین بار است که ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه یک DNA واکسن کاندید برای HIV به‌کار گرفته شده‌اند. یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که این استراتژی موجب تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شود. نتایج حاصل از بررسی پاسخ‌های سایتوتوکسیک نیز نشان می‌دهد که DNA واکسن کاندید باعث القای پاسخ‌های سایتوتوکسیک

شده است؛ اما اثر افزایشی در گروه ۲ نسبت به گروه ۱ بهتر بوده است. بدین ترتیب که تزریق واکسن کاندید به همراه دو ادجوانت ژنی مذکور در حالتی که نسبت واکسن از ادجوانت‌های ژنی بیشتر باشد (گروه ۲)، الگوی سیتوکینی Th1 قدرتمندتری ایجاد می‌نماید.

یافته‌های حاضر نشان داد که استفاده از تزریق همزمان ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه DNA واکسن کاندید، موجب تقویت پاسخ‌ها ایمنی سلولی می‌شود؛ اما نسبت استفاده شده از ادجوانت ژنی به واکسن کاندید نقش مهمی دارد. یافته‌های علمی این تحقیق نشان می‌دهد که ظاهراً ادجوانت با دوز کمتر و DNA واکسن با دوز بالاتر باعث تحریک بیشتر سیستم ایمنی می‌شود. با توجه به این که یکی از عوامل مؤثر بر ایمنی‌زایی DNA واکسن، میزان بیان پروتئین واکسن مربوط است، شاید نسبت بالاتر واکسن کاندید در گروه ۲ نسبت به ادجوانت‌های ژنی باعث افزایش پاسخ‌های ایمنی شده است. با توجه به نقش سلول‌های دندریتیک در پاسخ ایمنی و اثر سیتوکین‌های مذکور برای درک بیشتر وقایع ایمنی در پاسخ به واکسن کاندید، مطالعات بیشتری در این زمینه و فهم اثر سلول‌های دندریتیک بالغ شده در این ریزمحیط نیاز است تا حقایق بیشتری در این زمینه آشکار شود. محققان حاضر در نظر دارند تا در مطالعات آتی با به‌کارگیری استراتژی تقویت اولیه (Prime-Boost)، پاسخ‌های ایمنی همورال را به‌خوبی تحریک کنند و اثر سیتوکین‌های مذکور را بر پاسخ‌های همورال بررسی نمایند. همچنین در نظر دارند در مورد سلول‌های T خاطره‌ای و زیرجمعیت‌های آنها مطالعاتی انجام دهند و اثر سیتوکین‌های مذکور را بر زیرجمعیت‌های سلول‌های خاطره‌ای مطالعه نمایند.

۵- تشکر و قدردانی

از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تأمین بخشی از هزینه این پژوهش تشکر می‌گردد. نویسندگان از خانم‌ها مرضیه هلاکویی

می‌شود و به‌کارگیری ادجوانت‌های ژنی مذکور موجب تقویت پاسخ‌های سایتوتوکسیک شده است. از سوی دیگر استفاده ترکیبی از ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF به همراه واکسن کاندید باعث افزایش پاسخ‌های تکثیری نسبت به سایر گروه‌ها شده است. اما این افزایش تنها نسبت به گروه ۳ اختلاف معنی‌دار داشته است. یافته‌های پولندران (Pulendran) و همکارانش نشان می‌دهد که تمایز سلول‌های بنیادی در حضور IL-15 و GM-CSF موجب تولید سلول‌های دندریتیک می‌شود که در القای پاسخ‌های ایمنی سلولی بسیار توانمند هستند [۴۰]. با توجه به این که سلول‌های دندریتیک در القای پاسخ‌های ایمنی نقش اساسی و مهمی دارند [۴۱]، به نظر می‌رسد شاید افزایش پاسخ‌های ایمنی سلولی مشاهده شده به‌واسطه آثار سیتوکین‌های مذکور بر سلول‌های دندریتیک در ریزمحیط پاسخ ایمنی به واکسن باشد. یافته‌های تحقیق حاضر در مورد الگوی سیتوکینی نشان می‌دهد که تزریق DNA واکسن کاندید موجب افزایش تعداد سلول‌های تولیدکننده IL-4 و IFN- γ با برتری الگوی Th1 شده است و تزریق ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF موجب تقویت پاسخ سیتوکین‌های مذکور شده است؛ به‌گونه‌ای که به‌کارگیری IL-15 با الگوی بسیار قدرتمند Th1 همراه بوده، اما تزریق GM-CSF به همراه واکسن موجب تحریک هر دو الگوی سیتوکینی Th1 و Th2 شده است. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که به‌کارگیری IL-15 به‌عنوان ادجوانت موجب القای قدرتمند ایمنی سلولی و الگوی سیتوکین IFN- γ می‌شود [۲۷، ۴۲]. همچنین یافته‌های متعددی در مورد اثر ادجوانتی GM-CSF، نشان می‌دهد که این سیتوکین الگوهای سیتوکینی متفاوتی از خود نشان می‌دهد و بسته به نوع واکسن و زمان تزریق نسبت به واکسن کاندید، الگوی سیتوکینی متفاوتی از خود نشان می‌دهد [۱۵، ۱۷، ۲۱]. در پژوهش قبلی محققان حاضر در مورد GM-CSF به همراه DNA واکسن کاندید و ویروس هپاتیت C، تحریک هر دو سیتوکین IL-4 و IFN- γ مشاهده شد [۴۳]. نتایج این تحقیق یافته‌های گذشته محققان حاضر را تأیید نموده است. همچنین به‌کارگیری ترکیبی ادجوانت‌های ژنی IL-15 و GM-CSF موجب تقویت پاسخ هر دو سیتوکین‌های مذکور

دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران به دلیل اهدای ژن‌های GM-CSF و IL-15 سپاسگزاری می‌نمایند.

و لادن لنگرودی تقدیر و تشکر می‌نمایند. همچنین از خانم دکتر کریستینه هارطونیان از بخش بیوتکنولوژی دارویی

۶- منابع

- [1] Beattie T, Rowland-Jones S, Kaul R. HIV-1 and AIDS: what are protective immune responses? *J HIV Ther* 2002 May; 7(2): 35-9.
- [2] Chilongozi D, Wang L, Brown L, Taha T, Valentine M, Emel L, Sinkala M, Kafulafula G, Noor RA, Read JS, Brown ER, Goldenberg RL, Hoffman I; HIVNET 024 Study Team. Morbidity and mortality among a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected pregnant women and their infants from Malawi, Zambia, and Tanzania. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27(9): 808-14.
- [3] Manickan E, Karem KL, Rouse BT. DNA vaccines -- a modern gimmick or a boon to vaccinology? *Crit Rev Immunol* 1997; 17(2): 139-54.
- [4] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-74.
- [5] Obregon P, Chargelegue D, Drake PM, Prada A, Nuttall J, Frigerio L, Ma JK. HIV-1 p24-immunoglobulin fusion molecule: a new strategy for plant-based protein production. *Plant Biotechnol J* 2006; 4(2): 195-207.
- [6] Zuñiga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, Hernandez A, Sanchez H, Frahm N, Linde CH, Hewitt HS, Hildebrand W, Altfeld M, Allen TM, Walker BD, Korber BT, Leitner T, Sanchez J, Brander C. Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol* 2006; 80(6): 3122-5.
- [7] Masopust D. Developing an HIV cytotoxic T-lymphocyte vaccine: issues of CD8 T-cell quantity, quality and location. *J Intern Med* 2009; 265(1): 125-37.
- [8] Gudmundsdotter L, Bernasconi D, Hejdeman B, Sandstrom E, Alaeus A, Lidman K, Ensoli B, Wahren B, Buttò S. Cross-clade immune responses to Gag p24 in patients infected with different HIV-1 subtypes and correlation with HLA class I and II alleles. *Vaccine* 2008; 26(40): 5182-7.
- [9] Brave A, Gudmundsdotter L, Gasteiger G, Hallermalm K, Kastentmuller W, Rollman E, Boberg A, Engström G, Reiland S, Cosma A, Drexler I, Hinkula J, Wahren B, Erfle V. Immunization of mice with the nef gene from Human Immunodeficiency Virus type 1: Study of immunological memory and long-term toxicology. *Infect Agent Cancer* 2007; 2: 14.
- [10] Majumder B, Gray B, McBurney S, Schaefer TM, Dentchev T, Mahalingam S, Reinhart TA, Ayyavoo V. Attenuated nef DNA vaccine construct induces cellular immune response: role in HIV-1 multiprotein vaccine. *Immunol Lett* 2003; 89(2-3): 207-14.
- [11] Currier JR, Viswapoka U, Tovanabutra S, Mason CJ, Birx DL, McCutchan FE, Cox JH.

- CTL epitope distribution patterns in the Gag and Nef proteins of HIV-1 from subtype A infected subjects in Kenya: use of multiple peptide sets increases the detectable breadth of the CTL response. *BMC Immunol* 2006; 7: 8.
- [12]Kong WP, Wu L, Wallstrom TC, Fischer W, Yang ZY, Ko SY, Letvin NL, Haynes BF, Hahn BH, Korber B, Nabel GJ. Expanded breadth of the T-cell response to mosaic human immunodeficiency virus type 1 envelope DNA vaccination. *J Virol* 2009; 83(5): 2201-15.
- [13]Blondelle SE, Moya-Castro R, Osawa K, Schroder K, Wilson DB. Immunogenically optimized peptides derived from natural mutants of HIV CTL epitopes and peptide combinatorial libraries. *Biopolymers* 2008; 90(5): 683-94.
- [14]Azizi A, Anderson DE, Torres JV, Ogral A, Ghorbani M, Soare C, Sandstrom P, Fournier J, Diaz-Mitoma F. Induction of broad cross-subtype-specific HIV-1 immune responses by a novel multivalent HIV-1 peptide vaccine in cynomolgus macaques. *J Immunol* 2009; 180(4): 2174-86.
- [15]Barouch DH, Santra S, Tenner-Racz K, Racz P, Kuroda MJ, Schmitz JE, Jackson SS, Lifton MA, Freed DC, Perry HC, Davies ME, Shiver JW, Letvin NL. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *J Immunol* 2002; 168(2): 562-8.
- [16]Forni G, Boggio K. Cytokine gene-engineered vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 1999; 1(1): 34-8.
- [17]Tenbusch M, Kuate S, Tippler B, Gerlach N, Schimmer S, Dittmer U, Uberla K. Coexpression of GM-CSF and antigen in DNA prime-adenoviral vector boost immunization enhances polyfunctional CD8+ T cell responses, whereas expression of GM-CSF antigen fusion protein induces autoimmunity. *BMC Immunol* 2008; 9: 13.
- [18]Kokaji AI, Hockley DL, Kane KP. IL-15 transpresentation augments CD8+ T cell activation and is required for optimal recall responses by central memory CD8+ T cells. *J Immunol* 2008; 180(7): 4391-401.
- [19]Oh S, Perera LP, Terabe M, Ni L, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15 as a mediator of CD4+ help for CD8+ T cell longevity and avoidance of TRAIL-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(13): 5201-6.
- [20]Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA, Perera LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(6): 3392-7.
- [21]Kusakabe K, Xin KQ, Katoh H, Sumino K, Hagiwara E, Kawamoto S, Okuda K, Miyagi Y, Aoki I, Nishioka K, Klinman D, Okuda K. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J Immunol* 2000; 164(6): 3102-11.
- [22]Haddad D, Ramprakash J, Sedegah M, Charoenvit Y, Baumgartner R, Kumar S, Hoffman SL, Weiss WR. Plasmid vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles. *J Immunol* 2000; 165(7): 3772-81.
- [23] Lori F, Weiner DB, Calarota SA, Kelly LM, Lisziewicz J. Cytokine-adjuvanted HIV-DNA vaccination strategies. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28(3): 231-8.
- [24] Mueller YM, Petrovas C, Bojczuk PM, Dimitriou ID, Beer B, Silvera P, Villinger F, Cairns JS, Gracely EJ, Lewis MG, Katsikis PD. Interleukin-15 increases effector memory CD8+ t cells and NK Cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol* 2005; 79(8): 4877-85.
- [25] Mueller YM, Makar V, Bojczuk PM, Witek J, Katsikis PD. IL-15 enhances the function and inhibits CD95/Fas-induced apoptosis of human CD4+ and CD8+ effector-memory T cells. *Int Immunol* 2003; 15(1): 49-58.
- [26] Niedbala W, Wei X, Liew FY. IL-15 induces type 1 and type 2 CD4+ and CD8+ T cells proliferation but is unable to drive cytokine production in the absence of TCR activation or IL-12 / IL-4 stimulation in vitro. *Eur J Immunol* 2002; 32(2): 341-7.
- [27] Li W, Li S, Hu Y, Tang B, Cui L, He W. Efficient augmentation of a long-lasting immune responses in HIV-1 gag DNA vaccination by IL-15 plasmid boosting. *Vaccine* 2008; 26(26): 3282-90.
- [28] Ewen CL, Rong J, Kokaji AI, Bleackley RC, Kane KP. Evaluating antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses by a novel mouse granzyme B ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 2006; 308(1-2): 156-66.
- [29] Kennedy JS, Co M, Green S, Longtine K, Longtine J, O'Neill MA, Adams JP, Rothman AL, Yu Q, Johnson-Leva R, Pal R, Wang S, Lu S, Markham P. The safety and tolerability of an HIV-1 DNA prime-protein boost vaccine (DP6-001) in healthy adult volunteers. *Vaccine* 2008; 26(35): 4420-4.
- [30] Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, Mothé BR, Steffen S, Boyson JE, Shipley T, Fuller J, Hanke T, Sette A, Altman JD, Moss B, McMichael AJ, Watkins DI. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol* 2000; 164(9): 4968-78.
- [31] Pal R, Wang S, Kalyanaraman VS, Nair BC, Whitney S, Keen T, Hocker L, Hudacik L, Rose N, Cristillo A, Mboudjeka I, Shen S, Wu-Chou TH, Montefiori D, Mascola J, Lu S, Markham P. Polyvalent DNA prime and envelope protein boost HIV-1 vaccine elicits humoral and cellular responses and controls plasma viremia in rhesus macaques following rectal challenge with an R5 SHIV isolate. *J Med Primatol* 2005; 34(5-6): 226-36.
- [32] Thakar MR, Bhonge LS, Lakhashe SK, Shankarkumar U, Sane SS, Kulkarni SS, Mahajan BA, Paranjape RS. Cytolytic T lymphocytes (CTLs) from HIV-1 subtype C-infected Indian patients recognize CTL epitopes from a conserved immunodominant region of HIV-1 Gag and Nef. *J Infect Dis* 2005; 192(5): 749-59.

- [33] Kaufmann DE, Bailey PM, Sidney J, Wagner B, Norris PJ, Johnston MN, Cosimi LA, Addo MM, Lichterfeld M, Altfeld M, Frahm N, Brander C, Sette A, Walker BD, Rosenberg ES. Comprehensive analysis of human immuno-deficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol* 2004; 78(9): 4463-77.
- [34] Xu R, Megati S, Roopchand V, Luckay A, Masood A, Garcia-Hand D, Rosati M, Weiner DB, Felber BK, Pavlakis GN, Sidhu MK, Eldridge JH, Egan MA. Comparative ability of various plasmid-based cytokines and chemokines to adjuvant the activity of HIV plasmid DNA vaccines. *Vaccine* 2008; 26(37): 4819-29.
- [35] Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, Okuda K. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J Immunol* 1997; 159(7): 3638-47.
- [36] Spearman P, Kalams S, Elizaga M, Metch B, Chiu YL, Allen M, Weinhold KJ, Ferrari G, Parker SD, McElrath MJ, Frey SE, Fuchs JD, Keefer MC, Lubeck MD, Egan M, Braun R, Eldridge JH, Haynes BF, Corey L; NIAID HIV Vaccine Trials Network. Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial. *Vaccine* 2009; 27(2): 243-9.
- [37] Saikh KU, Kissner TL, Nystrom S, Ruthel G, Ulrich RG. Interleukin-15 increases vaccine efficacy through a mechanism linked to dendritic cell maturation and enhanced antibody titers. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(1): 131-7.
- [38] Villinger F, Miller R, Mori K, Mayne AE, Bostik P, Sundstrom JB, Sugimoto C, Ansari AA. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. *Vaccine* 2004; 22(25-26): 3510-21.
- [39] Leone A, Picker LJ, Sodora DL. IL-2, IL-7 and IL-15 as immuno-modulators during SIV/HIV vaccination and treatment. *Curr HIV Res* 2009; 7(1): 83-90.
- [40] Pulendran B, Dillon S, Joseph C, Curiel T, Banchereau J, Mohamadzadeh M. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8+ Tc1 responses in vivo. *Eur J Immunol* 2004; 34(1): 66-73.
- [41] Kutzler MA, Weiner DB. Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J Clin Invest* 2004; 114(9): 1241-4.
- [42] Bolesta E, Kowalczyk A, Wierzbicki A, Eppolito C, Kaneko Y, Takiguchi M, Stamatatos L, Shrikant PA, Kozbor D. Increased level and longevity of protective immune responses induced by DNA vaccine expressing the HIV-1 Env glycoprotein when combined with IL-21 and IL-15 gene delivery. *J Immunol* 2006; 177(1): 177-91.

- [43] Hartoonian C, Ebtekar M, Soleimanjahi H, Karami A, Mahdavi M, Rastgoo N, Azadmanesh K. Effect of immunological adjuvants: GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor) and IL-23 (interleukin-23) on immune responses generated against hepatitis C virus core DNA vaccine. *Cytokine* 2009; 46(1): 43-50.